

·实验研究·

本文引用:颜思阳,杨仁义,刘利娟,马强,李俊熙,周德生.基于“STAT3/miR-17”反馈环探讨活血荣络方对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用机制[J].湖南中医药大学学报,2021,41(4):489-497.

## 基于“STAT3/miR-17”反馈环探讨活血荣络方对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用机制

颜思阳<sup>1</sup>,杨仁义<sup>1</sup>,刘利娟<sup>2</sup>,马强<sup>1</sup>,李俊熙<sup>1</sup>,周德生<sup>2\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410007;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

**[摘要]** 目的 探讨活血荣络方对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及对线粒体自噬的影响。方法 采用生物信息学方法挖掘脑梗死差异表达 miRNAs,并预测活血荣络方可能通过调节“STAT3-miR-17”反馈环路发挥作用。将SD雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、活血荣络方组,运用线栓法建立脑缺血再灌注模型。造模前36、12 h及术后12 h给药。术后24 h行神经功能评分,并行TTC染色评估脑梗死体积;透射电镜观察自噬小体;Western blot检测线粒体及自噬相关蛋白,评估线粒体自噬情况;Real-time PCR检测“STAT3-miR-17”反馈环中miRNA、mRNA的表达。结果 与模型组相比,活血荣络方可明显改善模型大鼠神经功能损伤,减少脑梗死体积( $P<0.01$ ),下调p62、TOMM20的表达( $P<0.05$ ),上调LC3B的表达( $P<0.01$ ),增加损伤侧脑组织自噬小体;下调miR-17 miRNA的表达( $P<0.01$ ),上调STAT3 mRNA的表达( $P<0.01$ )。结论 活血荣络方可通过上调线粒体自噬发挥神经保护作用,其机制可能与调控“STAT3-miR-17”反馈环路相关。

**[关键词]** 脑梗死;活血荣络方;STAT3;miR-17;反馈环;线粒体自噬

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.001

### Explore the Protective Mechanism of Huoxue Rongluo Decoction on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury Model Rats Based on the Feedback Loop of "STAT3/miR-17"

YAN Siyang<sup>1</sup>, YANG Renyi<sup>1</sup>, LIU Lijuan<sup>2</sup>, MA Qiang<sup>1</sup>, LI Junxi<sup>1</sup>, ZHOU Desheng<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect of Huoxue Rongluo Decoction on ischemia/reperfusion injury rats and its influence on mitochondrial autophagy. **Methods** Bioinformatics method was used to mine the differently expressed miRNAs in cerebral infarction, and it was predicted that Huoxue Rongluo Decoction might play a role by regulating the "STAT3-miR-17" feedback loop. SD male rats were randomly divided into sham operation group, model group, and Huoxue Rongluo Decoction group, and the cerebral ischemia reperfusion model was established by thread plug method. Drugs were administered at 36 and 12 hours before modeling and 12 hours after surgery. Neural function score was performed 24 hours after operation, and cerebral infarction

**[收稿日期]** 2020-12-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81874463);湖南省科技厅项目(2017SK4005);湖南省财政中医药项目名院工程院内优势病种项目(rsk-010-013/006-09);湖南省中医药管理局资助项目(201824,202046,202038);湖南省教育厅一般项目(20C1405);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2019ZXYJH08,2018ZXYJH10);湖南省研究生创新项目(CX20190587);湖南中医药大学研究生培养质量工程专项(2020CX62,2018CX07)。

**[作者简介]** 颜思阳,女,在读博士研究生,研究方向:中医药防治神经系统疾病。

**[通讯作者]** \*周德生,男,主任医师,博士研究生导师,E-mail:2478020529@qq.com。

volume was assessed by TTC staining; autophagosomes were observed by transmission electron microscope; mitochondria and autophagy-related proteins were detected by Western blot to assess mitochondrial autophagy; real-time PCR was used to detect the expression of miRNA and mRNA in the feedback loop of "STAT3-miR-17". **Results** Compared with the model group, Huoxue Rongluo Decoction can significantly improve the neurological damage, reduce cerebral infarction volume of rats ( $P<0.01$ ), down-regulate the expressions of p62 and TOMM20 ( $P<0.05$ ), up-regulate the expression of LC3II ( $P<0.01$ ), and increase autophagosomes in the injured brain tissue; down-regulate the expression of miR-17 miRNA ( $P<0.01$ ), up-regulate the expression of STAT3 mRNA ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Huoxue Rongluo Decoction exerts neuroprotective effect by moderately up-regulating mitochondrial autophagy, and its mechanism may be related to the regulation of "STAT3-miR-17" feedback loop.

[**Keywords**] cerebral infarction; Huoxue Rongluo Decoction; STAT3; miR-17; feedback loop; mitochondrial autophagy

脑血管病是全球第二大死亡原因,也是全世界致残的第三常见原因,具有高死亡率、致残率和复发率的特点<sup>[1-2]</sup>。同时,研究显示我国脑血管疾病负担在脑出血呈缓慢下降趋势时,脑梗死上升趋势较明显<sup>[3]</sup>。因此,脑梗死的防治具有重要的社会意义。线粒体自噬作为一种特殊的自噬类型,可以选择性地清除受损线粒体,其在应激状态中(如缺氧、钙超载等)起着至关重要的作用。脑缺血再灌注引发的级联反应可激活线粒体自噬这一过程<sup>[4]</sup>,但目前对于线粒体自噬在脑缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R)的作用仍存在争议。

脑梗死属中医学“缺血性中风”范畴。荣气,为一切精微物质的总称<sup>[5]</sup>。因其具备精微物质属性,又具有气化运动的功能,而荣气虚与荣气滞互为因果、消长共存,导致气化失司、内邪交互、神机失用,发为脑梗死<sup>[6]</sup>。基于中西医结合方法论,将线粒体的生理、病理与荣气理论相联系,认为荣气的物质属性相当于现代医学的线粒体,而线粒体的功能可以体现荣气的作用<sup>[7]</sup>。

基于荣气虚滞理论创制的活血荣络方为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂,广泛应用于临床。前期研究<sup>[8]</sup>表明活血荣络方能够作用于线粒体,可减轻线粒体活性氧的产生,降低线粒体钙超载等。但其调控脑梗死后线粒体自噬的作用机制有待进一步研究。本项目利用生物信息学方法结合脑缺血再灌注大鼠模型,筛选“转录因子(transcription factors, TF)-miRNA”反馈环及下游效应机制,探讨活血荣络方对 I/R 的保护作用及对线粒体自噬的影响。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

2~3 月龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体质量 250~

280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002。饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心(通风良好,昼夜交替 12 h,温度 21~26 °C,湿度 40%~50%)。实验经湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批准号:20201010-13)。

### 1.2 主要药物及试剂

活血荣络方(院内制剂):鸡血藤 30 g,石楠藤 30 g,生地黄 15 g,玄参 10 g,黄精 15 g,乳香 10 g,没药 10 g,川芎 10 g。各药混合置于圆底烧瓶中,加 10 倍量水浸泡 12 h 后用冷凝回流装置加热回流 2 h,提取液过滤,残渣加 8 倍量水,继续冷凝回流 1 h,提取液过滤,合并 2 次过滤液于旋转蒸发仪上进行浓缩,即得活血荣络方浸膏,无菌玻璃瓶分装,4 °C 贮存备用。根据人动物体表面积换算法(给药剂量=0.018×人给药剂量/大鼠体质量),大鼠每天灌胃剂量约为 11.7 g/kg。

BCA 蛋白定量试剂盒(货号:70-PQ0012,杭州联科生物技术股份有限公司);SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(货号:CW0022S,北京康为世纪生物科技有限公司);Immobilon Western HRP 底物(货号:WBKLS0100,美国 Millipore 公司);PageRuler™ Prestained Protein Ladder(货号:26616,美国赛默飞世尔科技公司);抗体:LC3B、p62、TOMM20、Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)(货号:ab48394、ab91526、ab186735、ab150120,英国 Abcam 公司);HyPure™ Molecular Biology Grade Water(货号:SH30538.02,美国 HyClone 公司);RNA 提取液、Servicebio™ RT First Strand cDNA Synthesis Kit、2×SYBR Green qPCR Master Mix (Low ROX)(货号:G3013、G3330、G3321,武汉赛维尔生物科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

透射电镜(型号:Tecnai G2 Spirit Bio TWIN, 美国FEI公司);小型Mini-Protean® Tetra垂直电泳槽、小型Trans-blot®转印槽、Power Pac™ Basic基础电泳仪(电源)、化学凝胶成像分析仪、荧光定量PCR仪(型号:1658001,1703930,1645050,Chemi Doc™ XRS+、CFX96™,美国Bio-Rad公司);PVDF膜(规格:26.5 cm×3.75 m/卷,0.22 μm,货号:ISEQ00010,美国Millipore公司);台式高速冷冻型微量离心机(型号:D3024R,中国DragonLab公司);超微量分光光度计(型号:NanoDrop2000,美国Thermo Scientific公司);超净工作台(型号:SW-CJ-1FD,中国苏净安泰公司);标准试剂型纯水仪(型号:GBZ2001-uo-p,中国青岛富勒姆科技有限公司);多功能酶标仪(型号:Enspire,美国Perkinelmer公司)。

## 2 方法

### 2.1 “药物-疾病-表型”核心靶点筛选及富集分析

利用中药系统药理数据库(TCMSP, <https://tcm-spw.com/tcm-spw.php>)<sup>[9]</sup>及中医药整合药理学研究平台v2.0数据库(TCMIP, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/Login/login.html>),收集活血荣络方中主要药物(川芎、生地黄、黄精、鸡血藤、乳香、没药、玄参)的化学成分。以口服生物利用度(OB)≥30%<sup>[10]</sup>,化合物类药性(DL)≥0.18<sup>[11]</sup>为筛选条件,筛选出活血荣络方中具有较高活性的化合物。通过PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库<sup>[12]</sup>收集与校对候选化合物名称,并利用Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库<sup>[13]</sup>对候选化合物相关靶点进行预测,剔除无3D/2D化学结构、靶点化合物。

通过GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库<sup>[14]</sup>,以“Cerebral Ischemia”OR“Stroke”AND“Mitochondrial autophagy”(“脑缺血”或“卒中”和“线粒体自噬”)为检索词,收集脑梗死线粒体自噬的作用靶点。通过Bioinformatics Gent中Van de Peer Lab取交集获得活血荣络方与缺血性脑卒中线粒体自噬(“药物-疾病-表型”)的共同靶点。

将共同靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>)<sup>[15]</sup>,选择Multiple Protein,限定物种为Homo sapiens,设定最低要求互动分数为高度信度0.700<sup>[16]</sup>,获得PPI网络相关信息。导入Cytoscape软件,使PPI网络可视化,行Degree、Closeness、Betweenness拓扑分析,聚焦核心靶点。通过DAVID数据库对作用靶点进行GO、KEGG富集分析,利用R软件ggplot2包

对前10位进行可视化。

### 2.2 “mRNA-miRNA”反馈环路的构建

根据“2.1”筛选获得PPI、GO、KEGG富集分析结果,利用在线数据库TargetScan([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/))<sup>[17]</sup>、miRWalk(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)<sup>[18]</sup>、mirDIP(<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/index.jsp>)<sup>[19]</sup>、miRDB(<http://mirdb.org/>)<sup>[20]</sup>进行反向预测,筛选作用于“药物-疾病-表型”核心靶点的潜在miRNA。同时利用GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>),以“Cerebral infarction”或“Cerebral ischemia”为检索词,获取脑梗死miRNA芯片(GSE117064)<sup>[21]</sup>。R语言对数据表达矩阵行质量控制,采用limma包对表达矩阵进行差异性分析,以 $|\log_{2}FC| \geq 1$ 与 $\text{adj.P.Val} < 0.05$ 为筛选条件,筛选出脑梗死后差异表达的miRNA,绘制火山图及前50位热图。将其与核心靶点反向预测的miRNA取交集,筛选出脑梗死后差异表达并能调控核心靶点的miRNAs。

进一步利用数据库TransmiR v2.0筛选核心靶点可能调控的miRNAs,综合分析获得可能的“TF-miRNA”反馈环路。

### 2.3 动物模型的制备与评价

大鼠适应性喂养一周,术前12 h内禁食不禁水。以10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,麻醉满意后,参考Longa等<sup>[22]</sup>报道的大脑中动脉阻塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO),钝性分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA),从ECA与ICA分叉部约4 mm处斜45°剪口进栓线,插入栓线约18 mm梗阻右侧大脑中动脉;梗阻2 h后拔出栓线进行再灌注。假手术组分离CCA、ECA、ICA,不插入栓线,余过程同造模组。将大鼠保温至苏醒后分笼喂养,术后6 h再恢复进食。采用Zea-Longa's<sup>[22]</sup>标准评分法,评分1~3分大鼠纳入后续实验。

### 2.4 分组及给药

将30只SD大鼠随机分为3组,分别为假手术(Sham)组、模型(I/R)组、活血荣络方(HXRLF)组,每组10只。实验过程中出现死亡或取材时发现为脑出血、蛛网膜下腔出血等予以剔除,按需要以相同方法造模补充。

HXRLF组剂量参照前期实验<sup>[23]</sup>,每天灌胃给药11.7 g/kg,连续给药3次,分别为造模前36 h和12 h以及造模后12 h,Sham组和I/R组给予等剂量蒸馏水。

### 2.5 神经功能缺损评分

大鼠再灌注后,按Zea-Longa's五级标准评分

法对大鼠进行神经功能缺损评分<sup>[22]</sup>,评分等级为0~4分,分值越高,神经功能缺损越严重。其中0分无明显神经功能缺损;1分:提尾时对侧前肢不能完全伸直,爬行时向对侧转圈;2分:提尾时对侧前肢屈曲内收,爬行时向对侧转圈;3分:站立不稳,爬行时向偏瘫侧跌倒;4分:意识障碍,不能够自发行走。取评分在1~3分者进行后续实验。

## 2.6 TTC染色观察大鼠脑组织变化

再灌注24 h后,大鼠麻醉满意后固定,腹主动脉采血后快速断头取脑,于-20℃冰箱冷冻30 min,切除嗅球,沿冠状面切片,置于37℃水浴锅预热的2% TTC染液中,避光双面染色20 min。染色结束后于4%多聚甲醛中固定,4℃冰箱过夜后置于深色背景面观察,红色为正常脑组织,白色为梗死脑组织。缺血区脑梗死体积比=各切片白色缺血区面积之和/各切片脑片面积之和。用Image-J软件计算脑梗死面积并分析。

## 2.7 透射电镜观察各组大鼠脑组织中线粒体自噬现象

再灌注24 h后,大鼠深度麻醉后固定,腹主动脉采血后先后经心脏灌注生理盐水及4%多聚甲醛,灌注充分后断头取脑,分离出损伤侧皮质脑组织,于冰上制备成1 mm<sup>3</sup>大小的组织块,置于4℃预冷的戊二醛溶液中固定,电镜室包埋、检测。

## 2.8 Western blot法检测各组大鼠脑组织中LC3B、p62、TOMM20的表达水平

再灌注24 h后,大鼠深度麻醉下断头取脑,取损伤侧脑组织分装于冻存管中,液氮急冻后转移至-80℃冰箱保存。取相应组别大鼠脑组织置于冰上,加入裂解液(组织裂解液:PMSF=100:1)后,经组织捣碎均浆机充分研磨提取总蛋白。采用BCA法测定总蛋白浓度。蛋白上样量为3 μg/μL,10 μL/孔。经SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h,一抗(LC3B:1:1 000,p62:1:1 000,TOMM20:1:1 000)4℃孵育过夜,洗膜3次,10 min/

次,二抗(山羊抗兔:1:10 000)37℃恒温水浴箱孵育,再次洗膜后显色成像。使用Image-Lab检测图像灰度值并进行分析,以目的蛋白与β-actin灰度值的比值表示相对蛋白表达量。

## 2.9 Real-time PCR法检测各组大鼠脑组织“TF-miRNA”反馈环路miRNA、mRNA基因表达

取-80℃冻存的脑组织100 mg,加入1 mL Trizol Reagent,组织捣碎均浆机充分研磨提取总RNA,使用Nanodrop 2000检测RNA浓度及纯度。逆转录后,按试剂盒说明书进行扩增,反应体系为:2×qPCR Mix 7.5 μL,2.5 μM基因引物1.5 μL,反转录产物2.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 4.0 μL。预变性95℃10 min,循环(40次)95℃,15 s→60℃,60 s,熔解曲线60℃→95℃,每15 s升温0.3℃。miRNA内参为U6,mRNA内参为GAPDH,相对表达量用2<sup>-ΔΔCt</sup>表达。PCR引物序列见表1。

## 2.10 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,神经功能评分采用Mann-Whitney test分析,其余指标满足方差齐性,则各组间比较采用单因素方差分析进行比较,若不满足方差齐性,则采用Kruskal Wallis H检验。

## 3 结果

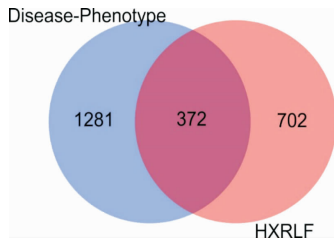
### 3.1 “药物-疾病-表型”核心靶点筛选及富集分析结果

通过TCMSP及TCMID数据库共获得符合筛选条件的活血荣络方中具有较高活性的化合物99个(川芎7个,生地黄2个,鸡血藤24个,玄参9个,黄精12个,乳香8个,没药45个)。通过Swiss Target Prediction数据库对筛选出的化合物进行相关靶点预测,剔除无化学结构式及无靶点化合物,得到活血荣络方可能作用的靶点1 109个。通过GeneCards数据库收集到脑梗死线粒体自噬靶点1 653个靶点。利用Bioinformatics Gent取交集获得活血荣络

表1 PCR引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
STAT3	正向引物:TTAACATTCTGGGCACGAACA	147
	反向引物:TGACAATCAAGGAGGCATCAC	
miR-17-5p	正向引物:CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACCTGC	67
	反向引物:ACACTCCAGCTGGGCAAAGTGCCTTACAGTGC	
U6	正向引物:CTCGCTTCGGCAGCACA	94
	反向引物:AACGCTTCACGAATTTGCCT	
GAPDH	正向引物:CTGGAGAAACCTGCCAACTATG	138
	反向引物:GCTGAAGAATGGGAGTTGCT	

方主要化合物与脑梗死线粒体自噬(药物-疾病-表型)共同靶点,共同靶点 372 个。见图 1。



注: Disease-Phenotype: 脑梗死线粒体自噬靶点; HXRLF: 活血荣络方作用靶点

图 1 “药物-疾病-表型”共同靶点韦恩图

利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对共同靶点蛋白进行相互作用网络聚焦, 分别行 Degree、Closeness、Betweenness 拓扑分析, 聚焦于前 10 位核心靶点。见图 2。

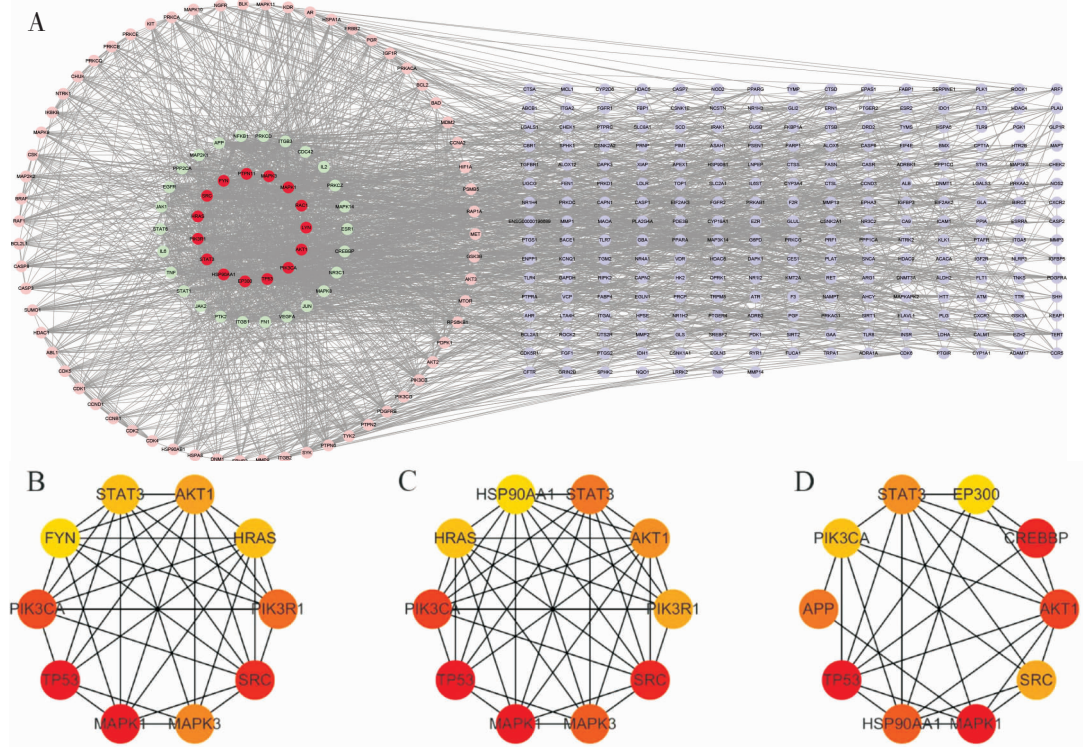
通过 DAVID 数据库对作用靶点进行 GO、KEGG 富集分析, 对 P 值取负对数, 得出“-lgP”值, -lgP 值越大, 富集程度越大, 筛选出富集程度前 10 位进行分析, 并利用 R 软件 ggplot2 分析包进行可视化。见图 3。活血荣络方作用靶点主要分布在胞质、胞核、溶酶体等细胞组分中, 通过调控 ATP 结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白质结合、转录因子

活性等, 调节多种蛋白磷酸化、炎症反应、对缺氧的反应、血管生成、转录、抑制凋亡等, 通过 HIF-1 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等调节脑梗死后线粒体自噬。结合前期研究<sup>[23-24]</sup>, 活血荣络方可激活脑梗死后 JAK2/STAT3 通路、调控 STAT3/miRNA 反馈环路, 激活下游 HIF-1 通路等。故本研究聚焦于 STAT3、HIF1- $\alpha$ , 进一步筛选相关 miRNAs。

### 3.2 “TF-miRNA”反馈环路的构建

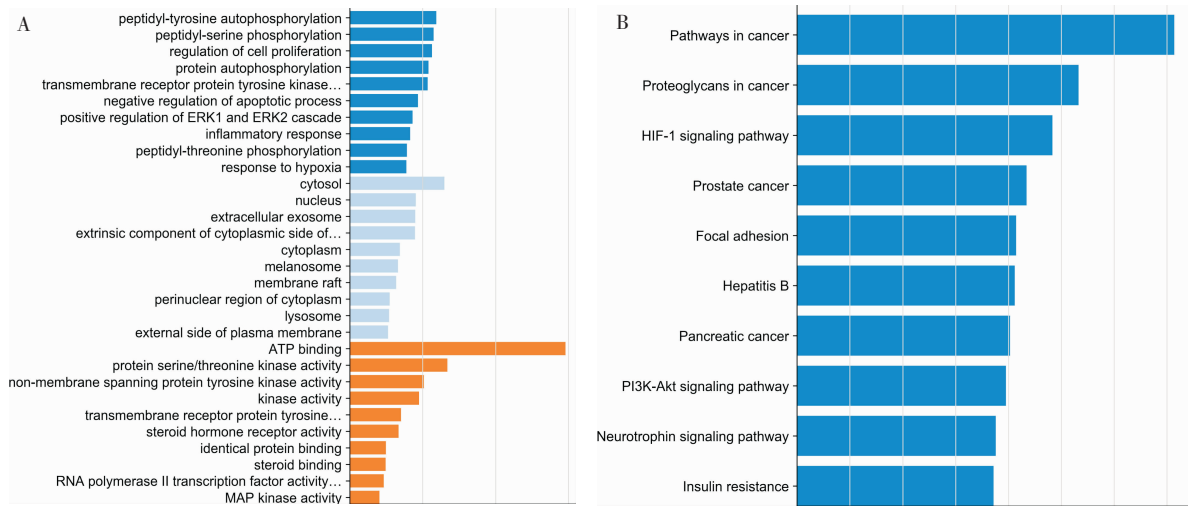
利用在线数据库 TargetScan、miRWalk、mirDIP、miRBD 进行反向预测, 筛选可能作用于 STAT3、HIF-1 $\alpha$  的潜在 miRNA, 其中 27 个可调控 STAT3, 64 个可调控 HIF-1 $\alpha$ , 见图 4。利用 GEO 数据库, 获取 GSE117064 数据集, 归一化与差异化分析后绘制差异 miRNAs 火山图, 结果表明脑梗死后差异表达的 miRNAs 共 2 565 个, 其中 1 799 个表达上调, 766 个表达下调。三者取交集得 2 个脑梗死后差异表达并能调控核心靶点的 miRNAs (miR-17-5p、miR-20b-5p)。见图 5。

进一步于 TransmiR v2.0 数据库中检索 STAT3、HIF-1 $\alpha$  调控表达的 miRNAs, 知 STAT3、HIF-1 $\alpha$  可转录调控 miR-17 的表达, 初步构成“STAT3-miR-17”、“HIF-1 $\alpha$ -miR-17”反馈环。而 STAT3 可作为 HIF-

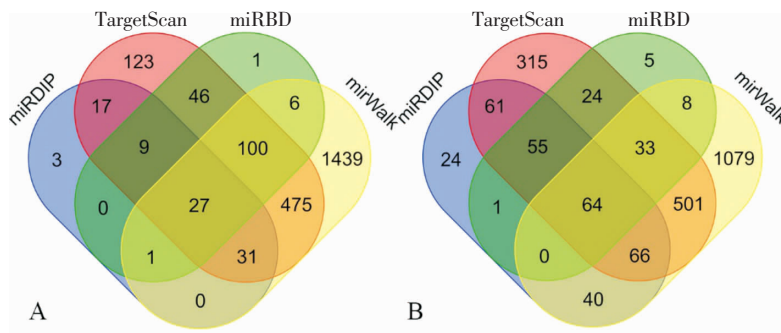


注: A.PPI 蛋白网络互作图, 紫色: Degree 值  $\leq 15$ , 粉色:  $15 < \text{Degree 值} \leq 30$ , 绿色:  $30 < \text{Degree 值} \leq 45$ , 红色: Degree 值  $> 45$ ; B-D. Degree、Closeness、Betweenness 拓扑分析图, 得分高低对应颜色红色-黄色渐变, 分值越高颜色越红

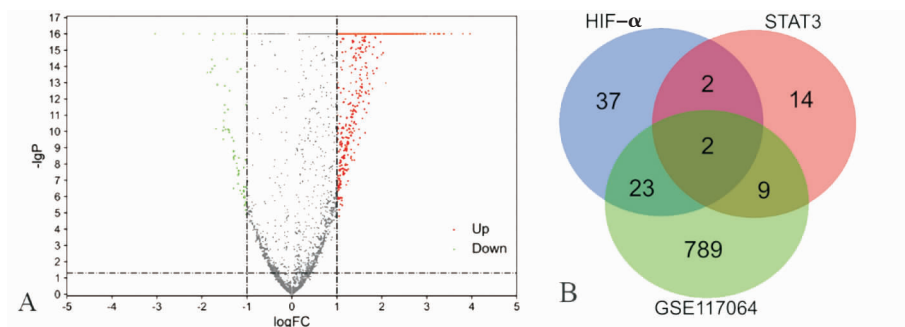
图 2 “药物-疾病-表型”共同靶点 PPI 蛋白网络互作图



注:A. GO 基因富集图;BP 为蓝色,CC 为浅蓝色,MF 为橙色;B. KEGG 富集分析图  
图 3 “药物-疾病-表型”共同靶点 GO、KEGG 富集分析图



注:A. STAT3 反向预测 miRNA;B. HIF-1 $\alpha$  反向预测 miRNA  
图 4 核心靶点反向预测 miRNAs



注:A.脑梗死后差异表达 miRNA 火山图;B.差异表达且调控核心靶点的 miRNA 韦恩图  
图 5 脑梗死后差异表达 miRNAs 图

1 $\alpha$  上游发挥作用,调控 HIF-1 $\alpha$  转录表达<sup>[25]</sup>。综上,整合多个数据库,预测活血荣络方可通过调控 STAT3/miRNA-17 反馈环介导下游通路调控脑梗死后线粒体自噬以保护受损脑组织。

综上,整合多个数据库,预测活血荣络方可通过调控 STAT3/miRNA-17 反馈环介导下游通路调控脑梗死后线粒体自噬以保护受损脑组织。

### 3.3 各组大鼠神经功能评分

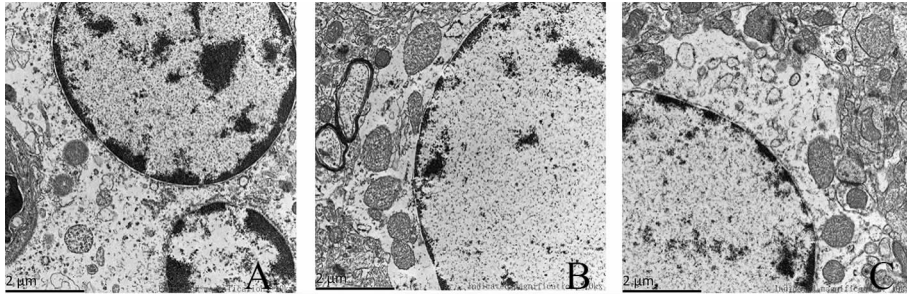
与 Sham 组比较,I/R 组神经功能评分明显升

高,神经功能缺损严重( $P<0.01$ );与 I/R 组相比,HXRLF 组评分降低,提示活血荣络方可改善神经功能缺损评分( $P<0.01$ )。见表 2。

表 2 神经功能评分( $\bar{x}\pm s, n=5, 分$ )

组别	神经功能评分
Sham 组	0.00 $\pm$ 0.00
I/R 组	3.10 $\pm$ 0.70**
HXRLF 组	1.90 $\pm$ 0.70 <sup>#</sup>

注:与 Sham 组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 I/R 组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$



注:A.Sham组;B.I/R组;C.HXRLF组;标尺:2 μm

图6 活血荣络方对I/R大鼠自噬水平的影响

### 3.4 各组大鼠TTC染色情况

TTC染色结果表明,与I/R组相比,活血荣络方可明显减少I/R大鼠损伤侧脑梗死体积。见表3。

表3 各组大鼠脑梗死体积比( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	脑梗死体积比
Sham组	0.00±0.00
I/R组	0.27±0.02**
HXRLF组	0.16±0.03 <sup>#</sup>

注:与Sham组比较,\*\* $P<0.01$ ;与I/R组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$

### 3.5 各组大鼠损伤侧脑组织透射电镜结果

损伤侧脑组织透射电镜结果显示,I/R组损伤侧脑组织中双层膜结构自噬小体较Sham组增多;与I/R组相比,HXRLF组双层膜结构的自噬小体明显增多。见图6。

### 3.6 各组大鼠脑组织中LC3B、p62、TOMM20的表达水平比较

与Sham组相比,I/R组损伤侧脑组织自噬相关蛋白LC3B、p62表达水平上调( $P<0.01$ ),线粒体膜蛋白TOMM20表达水平下调( $P<0.01$ );而与I/R组相比,活血荣络方可显著上调自噬相关蛋白LC3B( $P<0.01$ ),下调TOMM20和p62( $P<0.05$ )。见图7。

### 3.7 各组大鼠脑组织中“STAT3-miR-17”反馈环路mRNA及miRNA的表达

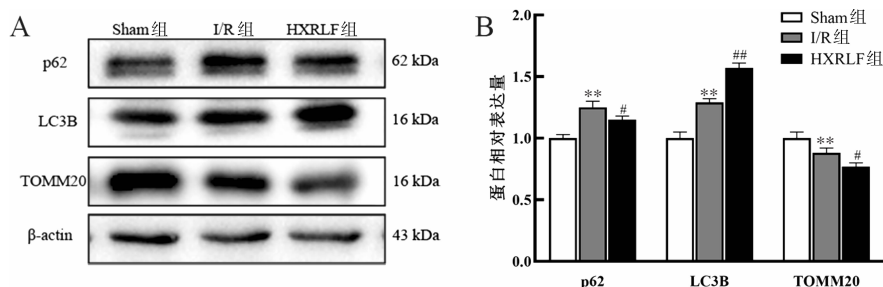
与Sham组比较,I/R组miR-17表达明显升高( $P<0.01$ ),STAT3 mRNA表达降低( $P<0.05$ );与I/R组比

较,HXRLF组miR-17的表达可明显下调( $P<0.01$ );STAT3 mRNA的表达上调( $P<0.01$ )。见图8。

## 4 讨论

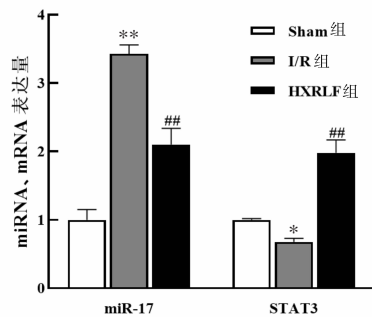
脑梗死会引起细胞内多种转录因子(transcription factors, TFs)、微/小分子RNA(microRNAs, miRNAs)发生变化。细胞核内某些TF可以调控特定miRNA的转录,上调其表达;而胞质中某些miRNA可与TF mRNA的3'UTR相结合,抑制其转录后翻译,下调蛋白表达,减少入核转录,进而下调miRNA的转录,构成特定的“TF-miRNA”反馈环路<sup>[24]</sup>。本研究采用生物信息学技术,结合前期研究<sup>[24]</sup>,预测活血荣络方可能调节“STAT3-miR-17”反馈环路以调控脑梗死后线粒体自噬以发挥脑保护作用。

荣气是一切精微物质的总称<sup>[9]</sup>,作为“动力工厂”的线粒体在某种意义上反映了“荣气”的作用。课题组基于荣气与线粒体的相关性,从荣气气化不足所致荣气虚与线粒体自噬过度及荣气气化阻滞所致荣气滞与线粒体自噬不足进行了阐释,揭示了荣气虚滞与线粒体自噬的相关性<sup>[7]</sup>。并制定了活血荣络方以调理气化来调整荣气的升降出入运动,使其恢复到气化神机的协调状态。前期研究<sup>[23,26]</sup>证实活血荣络方对MCAO/R大鼠起脑保护作用;并可改善线粒体功能<sup>[8]</sup>。因此,本研究采用MCAO/R大鼠模型,



注:A.Western blot电泳图;B.相对灰度值;与Sham组比较,\*\* $P<0.01$ ;与I/R组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$

图7 各组大鼠脑组织中LC3B、p62、TOMM20的表达水平



注:与 Sham 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 I/R 组比较,## $P < 0.01$

图 8 各组大鼠脑组织中 miR-17 miRNA、STAT3 mRNA 的表达水平

初步验证“STAT3-miRNA”反馈环在脑梗死中的作用及活血荣络方的调控作用。研究中发现,与模型组相比,活血荣络方可明显改善 I/R 组大鼠的神经功能缺血,减少脑梗死体积,增加自噬小体数量,上调线粒体自噬标记蛋白的表达,并可下调 miR-17 miRNA 的表达,上调 STAT3 mRNA 表达。提示活血荣络方的神经保护作用与上调线粒体自噬有关,其机制可能与调控“STAT3-miR-17”反馈环路相关。

STAT3 是多种细胞因子受体信号转导的基础,参与细胞自噬、增殖、凋亡、血管新生等多个生物过程<sup>[25,27]</sup>。应激状态下激活形成稳定的二聚体并进入细胞核,协调各种转录程序<sup>[28-29]</sup>,是自噬相关基因的主要转录增强子<sup>[25]</sup>。He 等<sup>[30]</sup>研究表明 miR-17 可直接靶向 STAT3 发挥作用。而 miR-17 与 STAT3 表达呈负相关,抑制 miR-17,可上调 STAT3、p-STAT3 的表达<sup>[31-32]</sup>。本研究表明,I/R 组 miR-17 miRNA 表达升高,而 STAT3 mRNA 有所下降;活血荣络方可抑制 miR-17 miRNA 的表达,上调 STAT3 mRNA 的表达。提示活血荣络方可能通过调节“STAT3-miR-17”调控下游相关通路发挥作用。

现有研究<sup>[25,33]</sup>表明,STAT3 可调节 HIF-1 $\alpha$  在低氧状态下的表达来执行其激活自噬的功能。亦可直接靶向 BNIP3 调控线粒体自噬的发生,其磷酸化可能增加 BNIP3 表达激活线粒体自噬<sup>[34-35]</sup>。此外,STAT3 向线粒体的易位可能在自噬调节中起关键作用<sup>[36]</sup>。而 LC3 作为自噬标记蛋白,主要包括胞质中的 LC3I (LC3A) 和定位于自噬小体膜上的 LC3II (LC3B) 两种形式,两者之间可相互转化,而 LC3II 通常被认为是自噬形成的标志分子。p62 可充当支架蛋白与 LC3 相结合,进而被溶酶体降解,其表达常与自噬水平呈

负相关,即自噬水平升高时,p62 的表达水平降低,反之,则表达升高;而当自噬小体与溶酶体形成受阻时,自噬小体的降解受阻,LC3II 和 p62 则会累积<sup>[37]</sup>。并选取了线粒体膜蛋白 TOMM20 来反应线粒体变化情况。研究发现,活血荣络方可上调 LC3B 的表达,并下调 p62、TOMM20 的表达,但对下游相关通路的调控作用有待进一步研究。

综上所述,活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织 I/R 损伤有保护作用。其可能机制与调节“STAT3/miR-17”反馈环路,上调线粒体自噬,清除受损线粒体,维持线粒体功能有关。为中医药研究提供新的研究方向或思路。

## 参考文献

- [1] GBD CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2018, 392(10159): 1736-1788.
- [2] GBD 2017 DALYs, HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2018, 392(10159): 1859-1922.
- [3] 彭琴,李海玲,王媛,等.1990-2016年中国人群脑血管病疾病负担变化趋势[J].中华流行病学杂志,2019,40(4):400-405.
- [4] ZHANG X N, YAN H J, YUAN Y, et al. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance[J]. Autophagy, 2013, 9 (9): 1321-1333.
- [5] 周德生,张雪花,谭静.荣气虚滞论[J].中医药通报,2005,4(2):22-25.
- [6] 周德生,陈湘鹏,胡华,等.脑梗死荣气虚滞病机特征之探讨[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(12):1560-1561,1576.
- [7] 颜思阳,周德生.基于荣气虚滞理论探讨脑梗死后线粒体自噬及临床辨治[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(6):1000-1002.
- [8] 陈湘鹏,周德生,胡华,等.活血荣络片对急性脑梗死患者血浆 CF6 及线粒体游离 Ca<sup>2+</sup>浓度水平的影响[J].河南中医,2016,36(6): 1006-1008.
- [9] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSPT: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. Journal of Cheminformatics, 2014, 6: 13.
- [10] TIAN S, LI Y Y, WANG J M, et al. ADME evaluation in drug discovery. 9. Prediction of oral bioavailability in humans based



- on molecular properties and structural fingerprints[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2011, 8(3): 841–851.
- [11] GIBALDI M, LEVY G. Pharmacokinetics in clinical practice. I. Concepts[J]. *JAMA*, 1976, 235(17): 1864–1867.
- [12] KIM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D1102–D1109.
- [13] GFELLER D, MICHELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(23): 3073–3079.
- [14] FISHILEVICH S, NUDEL R, RAPPAPORT N, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards[J]. *Database*, 2017, 2017: 1–17.
- [15] VON MERING C, JENSEN L J, SNEL B, et al. STRING: known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: D433–D437.
- [16] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47 (D1): D607–D613.
- [17] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15–20.
- [18] DING J, LI X M, HU H Y. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32 (18): 2768–2775.
- [19] TOKAR T, PASTRELLO C, ROSSOS A, et al. mirDIP 4.1–integrative database of human microRNA target predictions [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D360–D370.
- [20] CHEN Y H, WANG X W. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D127–D131.
- [21] SONODA T, MATSUZAKI J, YAMAMOTO Y, et al. Serum MicroRNA-based risk prediction for stroke[J]. *Stroke*, 2019, 50(6): 1510–1518.
- [22] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [23] 周颖臻,王洪海,周德生,等.活血荣络方对大鼠脑缺血再灌注损伤 JAK2、STAT3 表达的影响[J].*时珍国医国药*,2017,28(9): 2111–2114.
- [24] 杨仁义,周德生,傅馨莹,等.基于 STAT3/miRNA 反馈环路探讨中医药促脑梗死后血管新生的调控机制[J].*中国实验方剂学杂志*, 2020,26(20):221–228.
- [25] YOU L K, WANG Z G, LI H S, et al. The role of STAT3 in autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 729–739.
- [26] 周德生,刘利娟,寇志刚,等.活血荣络片对大鼠中动脉缺血模型大鼠脑组织微囊蛋白-1 表达的影响[J].*河北中医*,2016,38(1):80–84,163.
- [27] BROMBERG J F, WRZESZCZYNSKA M H, DEVGAN G, et al. Stat3 as an oncogene[J]. *Cell*, 1999, 98(3): 295–303.
- [28] SRIVASTAVA J, DIGIOVANNI J. Non-canonical Stat3 signaling in cancer[J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2016, 55(12): 1889–1898.
- [29] GUANIZO A C, FERNANDO C D, GARAMA D J, et al. STAT3: A multifaceted oncoprotein[J]. *Growth Factors*, 2018, 36 (1/2): 1–14.
- [30] HE M, WANG Q Y, YIN Q Q, et al. HIF-1 $\alpha$  downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: a role in myeloid leukemic cell differentiation[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2013. 20(3): 408–418.
- [31] 李国良,刘德衍,杨彦华,等.miR-17 及其靶基因 HIF-1 $\alpha$ 、STAT3 在心源性猝死心肌组织中的表达及其意义[J].*中国法医学杂志*, 2019,34(6):562–566.
- [32] WANG Z, YUAN W, LI B, et al. PEITC promotes neurite growth in primary sensory neurons via the miR-17-5p/STAT3/GAP-43 axis[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2019, 27(1): 82–93.
- [33] SHEN S S, NISO-SANTANO M, ADJEMIAN S, et al. Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity [J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(5): 667–680.
- [34] PRATT J, ANNABI B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1–MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells [J]. *Cellular Signalling*, 2014, 26(5): 917–924.
- [35] LI S, XIA Y, CHEN K, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates apoptosis and autophagy in concanavalin A-induced hepatitis by inhibiting BNIP3[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016, 10: 631–47.
- [36] SZCZEPANEK K, CHEN Q, LARNER A C, et al. Cytoprotection by the modulation of mitochondrial electron transport chain: The emerging role of mitochondrial STAT3[J]. *Mitochondrion*, 2012, 12(2): 180–189.
- [37] 余婧萍,宋祯彦,李富周,等.芍药苷通过促进细胞自噬抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 SH-SY5Y 细胞的氧化损伤[J].*湖南中医药大学学报*, 2020,40(6):653–659.